

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-342255

(43)Date of publication of application : 12.12.2000

(51)Int.Cl.

C12N 15/09

A01H 1/00

(21)Application number : 11-158024

(71)Applicant : JAPAN TOBACCO INC

(22)Date of filing : 04.06.1999

(72)Inventor : HIEI YOSHIHIRO
KASAOKA KEISUKE
ISHIDA YUJI

(54) IMPROVEMENT IN EFFICIENCY OF GENE TRANSFER TO PLANT CELL

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To improve the efficiency of gene transfer to a plant cell simply carried out through a bacterium of the genus *Agrobacterium* without damaging a tissue, to perform transformation and to better a breed by heat-treating a plant cell or a plant tissue.

SOLUTION: A plant cell or a plant tissue derived from a plant selected from the group consisting of rice plant, maize, lawn grass and tobacco is heat-treated at 33-60° C, preferably 35-55° C, more preferably 37-52° C for 5 seconds to 24 hours, especially preferably at 37-52° C for 5 minutes to 24 hours to improve the efficiency of gene transfer to a plant cell carried out through a bacterium of the genus *Agrobacterium*. Preferably the plant cell or plant tissue is derived from an angiosperm, a monocotyledon or a gramineous plant. Preferably after the plant cell or plant tissue is heat-treated or centrifuged, a gene transfer treatment is performed.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

(19)日本国特許庁 (J P) (12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号
特開2000-342255
(P2000-342255A)
(43)公開日 平成12年12月12日(2000.12.12)

(51)IntCl. ⁷	分類記号	FI
C12N 15/09		C12N 15/00
A01H 1/00		A01H 1/00
		A 2B030
		A 4B024

審査請求 未請求 請求項の数11 O L (全 16 頁)	
(21)出願番号	特願平11-158024
(22)出願日	平成11年6月4日(1999.6.4)
(71)出願人	000004569 日本たばこ産業株式会社 東京都港区虎ノ門二丁目2番1号
(72)発明者	張江井 祐弘 静岡県静岡市東原町700番地 日本たばこ産業株式会社農芸育種研究所内
(72)発明者	笠岡 啓介 静岡県静岡市東原町700番地 日本たばこ産業株式会社農芸育種研究所内
(74)代理人	10008546 井理士 谷川 英次郎
最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法

(57)【要約】

【課題】 従来のアグロバクテリウム法による遺伝子導入方法よりも高い効率で組織を付与することなく簡単に遺伝子導入を行うことができる、植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法を提供すること。
【解決手段】 植物細胞又は植物組織を熱処理することに伴う、アグロバクテリウム属細胞を介して行われる植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法を提供した。

【特許請求の範囲】

- 【請求項1】 植物細胞又は植物組織を熱処理することに伴う、アグロバクテリウム属細胞を介して行われる植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法。
【請求項2】 植物細胞又は植物組織を熱処理した後、遺伝子導入処理を行う請求項1記載の方法。
【請求項3】 熱処理が3℃～60℃の温度範囲で行われる請求項1又は2記載の方法。
【請求項4】 熱処理が3℃～5℃の温度範囲で行われる請求項3記載の方法。
【請求項5】 熱処理が37℃～52℃の温度範囲で行われる請求項4記載の方法。
【請求項6】 熱処理が5秒間～24時間の範囲で行われる請求項1ないし5のいずれか1項に記載の方法。
【請求項7】 37℃～52℃の温度下で1分間～24時間熱処理を行う請求項1又は2記載の方法。
【請求項8】 用いる植物細胞又は植物組織が被子植物由来である請求項1ないし7のいずれか1項に記載の方法。
【請求項9】 用いる植物細胞又は植物組織が单子葉植物由来である請求項8記載の方法。
【請求項10】 用いる植物細胞又は植物組織がイネ科植物由来である請求項9記載の方法。
【請求項11】 用いる植物細胞又は植物組織がイネ、トウモロコシ、シバ及びタバコから成る群より選ばれる植物由来である請求項8記載の方法。
【発明の詳細な説明】

- 【0001】 【発明の属する技術分野】 本発明は、植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法に関する。
【0002】 【従来の技術】 アグロバクテリウムによる形質転換法は、一般的に、効率が低い、導入される遺伝子のコピー数が少ない、T-DNAという特定の領域を断片化させることなく導入できる、短期間の培養により形質転換体を得ることができるため培養変異が少ないなど、多くの優れた特徴を持っている。このため、さまざまな植物種でも有用な形質転換の手段として広く用いられている。
【0003】 このように、アグロバクテリウム法は非常に優れた植物の形質転換方法であるが、形質転換の成否ならびに効率は、植物種、遺伝子型ならびに用いる植物組織に依存して大きく異なるのが現状である (Potrykus et al., 1998(参考文献(35)))。すなわち、形質転換に成功していない植物種があるほか、ごく一部の品種のみ形質転換が可能な植物種も多い。また、利用可能な組織が限定されており大量の材料を取り扱うことができない植物種もある。遺伝子組換えにより実用的な品種を作出するには、多数の形質転換植物を作出した上で、目的とする形質を持った系統を選抜する必要がある。しかしながら、この目的に即し多数の形質転換体を容易に得るこ

- とができる作物の種類は、現状では一部に限られている。したがって、このような問題を解決することができ、改良手法の開発が強く望まれている。
【0004】 アグロバクテリウムを介する形質転換方法自体は、植物種により供試材料や培養に用いる培地の組成などを異にするものの、材料となる組織にアグロバクテリウムの感染を被験させ、共存要素の遺伝形質転換細胞の選抜を行い、形質転換植物を作出するという操作ではほぼ共通している。材料となる植物組織に対しては、通常、必要に応じ滅菌処理を行うがそれ以外に特別な処理を施すことなくアグロバクテリウムの感染が行われる (Rogers et al., 1988(参考文献(36)), Visser 1991(参考文献(40)), McCormick 1991(参考文献(31)), Lindev et al., 1991(参考文献(30))。従って、形質転換系の改良は、アグロバクテリウムの遺系、ベクター構成、培地組成、選抜マーカー遺伝子やプロモーターの種類、供試組織の種類などを中心に研究が行われてきた。
【0005】 これに対し、アグロバクテリウムを被験する前の植物組織を、遺伝子導入がしやすい生理的狀態に変換するという考え方に基づく研究は、ほとんど行われていない。何らかの簡便な処理により、そのような生理的狀態に変換することができればいへん利用価値が高くなり、遺伝子導入効率の向上に加え、従来困難であった植物種や遺伝子型の形質転換を可能にする顕著な効果も期待される。これまでの植物細胞への前処理に関する研究例としては、パーチクルガン (Bridney et al., 1992(参考文献(6)))および超音波 (Prick et al., 1997(参考文献(39)))処理が上げられる。どちらか物理的に組織を付与することによってバクテリアの植物細胞内への侵入を促し、感染対象となる植物細胞を増加させることを目的としている。しかしながら、これは従来より広く行われているリフティスキ法 (Borsch et al., 1985(参考文献(19)))を免除させたものに過ぎず、新規な考え方に基づく処理法ではない。なお、効果の程度や汎用性は明らかでなく、一般的な手法として用いられないのが現状である。
【0006】 【発明が解決しようとする課題】 従って、本発明の目的は、従来のアグロバクテリウム法による遺伝子導入方法よりも高い効率で組織を付与することなく簡便に遺伝子導入を行うことができる、植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法を提供することである。
【0007】 【課題を解決するための手段】 本発明者らは、被験研究の結果、アグロバクテリウム属細胞を用いた遺伝子導入方法において、遺伝子導入に供する植物細胞又は植物組織を熱処理することにより、遺伝子導入効率を有意に向上させることができることを見出し本発明を完成した。
【0008】 すなわち、本発明は、植物細胞又は植物組

菌を向上させる方法を提供する。

【発明の実施の形態】本発明の方法では、アグロバクテリウム属菌を介した遺伝子導入方法において、遺伝子導入する植物細胞又は植物組織を熱処理し、常温まで冷却し、植物細胞又は植物組織は、熱処理し、常温まで冷却した後、アグロバクテリウム属細菌と接させる方法であつてもよいし、熱処理しながらアグロバクテリウム属細菌と接させる方法であつてもよい。また、熱処理し、常温まで冷却した後、熱処理しながらアグロバクテリウム属細菌と接させる方法であつてもよい。これらの方法のうち、好ましい方法としては、熱処理し、常温まで冷却した後、アグロバクテリウム属細菌と接させる方法である。

[illegible][illegible]

[0011] 本発明の方法は、アグロバクテリウム属菌と接合させる植物細胞又は植物組織として機能型シリアルを用いる、又は熱処理を行なうアグロバクテリウム属菌と接合させることを特徴とする。菌種の方法をその最も適切な実施方法自体としては、菌種の方法をその最も適切な実施方法自体とする。

[0012] アグロバクテリウム属菌を用いた植物細胞導入あるいは形質転換方法は、この分野において周知であり、広く用いられている。

400

特開2000-342255

(0.01.3)土壌細菌アグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) が多くの双子葉植物に根癌腫瘍病 (root call disease) を引き起こすことは古くから知られており、1970年代には、トプラズミが病原性に関与していること、さらにトプラズミが複製されることと発見された。その後、植物ゲノムに組み込まれることが発見された。その後にトプラズミは癌腫の増殖に必要なオナールン (サイトカイニン・オーキシン) の合成に関与する遺伝子が存在し、癌腫伝達因子となりながら植物体内で発現することが明らかにされた。トナールの切り出しと植物への伝達にはトプラズミ上でのギャランシス領域 (ori領域) に存在する遺伝子群が必要であり、またトナールが切り出され、植物細胞との両端に存在するボーダー配列が必要である。他のアグロバクテリウム属細菌である *Agrobacterium rhizogenes* もRTI(図4.1)による同様のシステムを有している (岡本ら1994)。

10014) アブハバケリウムの感染によってT-DNAが植物ゲノムに組み込まれるので、T-DNA上にある遺伝子が植物ゲノムに組み込まれる。しかしながら、T-DNA上にある遺伝子を植物ゲノムに組み込むことは、標準的な遺伝工学手法よりも大変な作業であるため、標準的な遺伝工学手法ではT-DNA上に遺伝子を挿入することは困難である。そのため、T-DNA上に外来遺伝子を挿入するための方法が開発された。

【0015】まず、腫瘍性のTTP/TPラズミドのT-DNAのホルモン合成伝因子が除去されたディスアーム型のD-NV93 (参考文獻(43))、C58Cl(GOV3850) (Zambryski et al., 1983 (参考文獻(14))), C58Cl(GOV3850) (Zambryski et al., 1983 (参考文獻(43))), OV7T11LSE (Fralley et al., 1985 (参考文獻(40)))とが作製された(図3)。

れらを用いることにより、所望の遺伝子をアグリ
リュウのミトコンドリアミソドのDNA中に、あるいは所望の
遺伝子を有するT-DNAをアグリバクテリウムに導入する
方法が明らかにされた。このうちの一つは、遺伝子が
宿主の細胞が関与する遺伝子の挿入が可能であり、大腸菌
が容易に所望の遺伝子の挿入が可能であり、アグリバクテリウムの
製ができる中間ベクターを、アグリバクテリウムの
スパーミットマトリミソドのDNA領域中に、三交叉
(tripartite mating) (Ottita et al., 1980 (参
照)) を介して相同組換えにより導入する方法で
あり、中間ベクターと呼ばれる (Fralley et al., 1980)

(参考文獻(20)) ; Zambwyski et al., 1983 (参考文獻(43)).

図59-140889号 (EPT16718), もう一つは、バイナリベクター (binary vector) 法とよばれるもので (1)

3) T-DNAの植物への組み込み及びT領域が必要であることが、機能するために同じプラスミド上に存在する必要があるという結果 (Hekkel et al., 1983 (参考文獻(21)) に基づいている。このT領域にはvirA, virB, virC, virD, virE, virF, virGの存在し、(植物バイオテクノロジー、VirE2, VirE3, VirE4, VirE5, VirE6, VirE7, VirE8, VirE9, VirE10, VirE11, VirE12, VirE13, VirE14, VirE15, VirE16, VirE17, VirE18, VirE19, VirE20, VirE21, VirE22, VirE23, VirE24, VirE25, VirE26, VirE27, VirE28, VirE29, VirE30, VirE31, VirE32, VirE33, VirE34, VirE35, VirE36, VirE37, VirE38, VirE39, VirE40, VirE41, VirE42, VirE43, VirE44, VirE45, VirE46, VirE47, VirE48, VirE49, VirE50, VirE51, VirE52, VirE53, VirE54, VirE55, VirE56, VirE57, VirE58, VirE59, VirE60, VirE61, VirE62, VirE63, VirE64, VirE65, VirE66, VirE67, VirE68, VirE69, VirE70, VirE71, VirE72, VirE73, VirE74, VirE75, VirE76, VirE77, VirE78, VirE79, VirE80, VirE81, VirE82, VirE83, VirE84, VirE85, VirE86, VirE87, VirE88, VirE89, VirE90, VirE91, VirE92, VirE93, VirE94, VirE95, VirE96, VirE97, VirE98, VirE99, VirE100, VirE101, VirE102, VirE103, VirE104, VirE105, VirE106, VirE107, VirE108, VirE109, VirE110, VirE111, VirE112, VirE113, VirE114, VirE115, VirE116, VirE117, VirE118, VirE119, VirE120, VirE121, VirE122, VirE123, VirE124, VirE125, VirE126, VirE127, VirE128, VirE129, VirE130, VirE131, VirE132, VirE133, VirE134, VirE135, VirE136, VirE137, VirE138, VirE139, VirE140, VirE141, VirE142, VirE143, VirE144, VirE145, VirE146, VirE147, VirE148, VirE149, VirE150, VirE151, VirE152, VirE153, VirE154, VirE155, VirE156, VirE157, VirE158, VirE159, VirE160, VirE161, VirE162, VirE163, VirE164, VirE165, VirE166, VirE167, VirE168, VirE169, VirE170, VirE171, VirE172, VirE173, VirE174, VirE175, VirE176, VirE177, VirE178, VirE179, VirE180, VirE181, VirE182, VirE183, VirE184, VirE185, VirE186, VirE187, VirE188, VirE189, VirE190, VirE191, VirE192, VirE193, VirE194, VirE195, VirE196, VirE197, VirE198, VirE199, VirE200, VirE201, VirE202, VirE203, VirE204, VirE205, VirE206, VirE207, VirE208, VirE209, VirE210, VirE211, VirE212, VirE213, VirE214, VirE215, VirE216, VirE217, VirE218, VirE219, VirE220, VirE221, VirE222, VirE223, VirE224, VirE225, VirE226, VirE227, VirE228, VirE229, VirE230, VirE231, VirE232, VirE233, VirE234, VirE235, VirE236, VirE237, VirE238, VirE239, VirE240, VirE241, VirE242, VirE243, VirE244, VirE245, VirE246, VirE247, VirE248, VirE249, VirE250, VirE251, VirE252, VirE253, VirE254, VirE255, VirE256, VirE257, VirE258, VirE259, VirE260, VirE261, VirE262, VirE263, VirE264, VirE265, VirE266, VirE267, VirE268, VirE269, VirE270, VirE271, VirE272, VirE273, VirE274, VirE275, VirE276, VirE277, VirE278, VirE279, VirE280, VirE281, VirE282, VirE283, VirE284, VirE285, VirE286, VirE287, VirE288, VirE289, VirE290, VirE291, VirE292, VirE293, VirE294, VirE295, VirE296, VirE297, VirE298, VirE299, VirE300, VirE301, VirE302, VirE303, VirE304, VirE305, VirE306, VirE307, VirE308, VirE309, VirE310, VirE311, VirE312, VirE313, VirE314, VirE315, VirE316, VirE317, VirE318, VirE319, VirE320, VirE321, VirE322, VirE323, VirE324, VirE325, VirE326, VirE327, VirE328, VirE329, VirE330, VirE331, VirE332, VirE333, VirE334, VirE335, VirE336, VirE337, VirE338, VirE339, VirE340, VirE341, VirE342, VirE343, VirE344, VirE345, VirE346, VirE347, VirE348, VirE349, VirE350, VirE351, VirE352, VirE353, VirE354, VirE355, VirE356, VirE357, VirE358, VirE359, VirE360, VirE361, VirE362, VirE363, VirE364, VirE365, VirE366, VirE367, VirE368, VirE369, VirE370, VirE371, VirE372, VirE373, VirE374, VirE375, VirE376, VirE377, VirE378, VirE379, VirE380, VirE381, VirE382, VirE383, VirE384, VirE385, VirE386, VirE387, VirE388, VirE389, VirE390, VirE391, VirE392, VirE393, VirE394, VirE395, VirE396, VirE397, VirE398, VirE399, VirE400, VirE401, VirE402, VirE403, VirE404, VirE405, VirE406, VirE407, VirE408, VirE409, VirE410, VirE411, VirE412, VirE413, VirE414, VirE415, VirE416, VirE417, VirE418, VirE419, VirE420, VirE421, VirE422, VirE423, VirE424, VirE425, VirE426, VirE427, VirE428, VirE429, VirE430, VirE431, VirE432, VirE433, VirE434, VirE435, VirE436, VirE437, VirE438, VirE439, VirE440, VirE441, VirE442, VirE443, VirE444, VirE445, VirE446, VirE447, VirE448, VirE449, VirE450, VirE451, VirE452, VirE453, VirE454, VirE455, VirE456, VirE457, VirE458, VirE459, VirE460, VirE461, VirE462, VirE463, VirE464, VirE465, VirE466, VirE467, VirE468, VirE469, VirE470, VirE471, VirE472, VirE473, VirE474, VirE475, VirE476, VirE477, VirE478, VirE479, VirE480, VirE481, VirE482, VirE483, VirE484, VirE485, VirE486, VirE487, VirE488, VirE489, VirE490, VirE491, VirE492, VirE493, VirE494, VirE495, VirE496, VirE497, VirE498, VirE499, VirE500, VirE501, VirE502, VirE503, VirE504, VirE505, VirE506, VirE507, VirE508, VirE509, VirE510, VirE511, VirE512, VirE513, VirE514, VirE515, VirE516, VirE517, VirE518, VirE519, VirE520, VirE521, VirE522, VirE523, VirE524, VirE525, VirE526, VirE527, VirE528, VirE529, VirE530, VirE531, VirE532, VirE533, VirE534, VirE535, VirE536, VirE537, VirE538, VirE539, VirE540, VirE541, VirE542, VirE543, VirE544, VirE545, VirE546, VirE547, VirE548, VirE549, VirE550, VirE551, VirE552, VirE553, VirE554, VirE555, VirE556, VirE557, VirE558, VirE559, VirE560, VirE561, VirE562, VirE563, VirE564, VirE565, VirE566, VirE567, VirE568, VirE569, VirE570, VirE571, VirE572, VirE573, VirE574, VirE575, VirE576, VirE577, VirE578, VirE579, VirE580, VirE581, VirE582, VirE583, VirE584, VirE585, VirE586, VirE587, VirE588, VirE589, VirE590, VirE591, VirE592, VirE593, VirE594, VirE595, VirE596, VirE597, VirE598, VirE599, VirE600, VirE601, VirE602, VirE603, VirE604, VirE605, VirE606, VirE607, VirE608, VirE609, VirE610, VirE611, VirE612, VirE613, VirE614, VirE615, VirE616, VirE617, VirE618, VirE619, VirE620, VirE621, VirE622, VirE623, VirE624, VirE625, VirE626, VirE627, VirE628, VirE629, VirE630, VirE631, VirE632, VirE633, VirE634, VirE635, VirE636, VirE637, VirE638, VirE639, VirE640, VirE641, VirE642, VirE643, VirE644, VirE645, VirE646, VirE647, VirE648, VirE649, VirE650, VirE651, VirE652, VirE653, VirE654, VirE655, VirE656, VirE657, VirE658, VirE659, VirE660, VirE661, VirE662, VirE663, VirE664, VirE665, VirE666, VirE667, VirE668, VirE669, VirE670, VirE671, VirE672, VirE673, Vir

「情報」とはこのvint、vint、vint、vint、vint、vint、vint、vintの全てを意味するものという。したがって、バイナリーベクターは、L-DNAを型化するシステムと大抵等しいものであり、複製可能な小さなガラスミッドを組み込んだものであり、これをディスプレイアスウェア型プログラムミッドとするのがバクテリアに導入して用いる。アグロバクテリウムへのプログラムのインストールには、エレクトロポレーション法や三系交雑法などの方法を行うことができる。バイナリーベクターには、pBUD9(Quian, 1984(参考文献(5))）、pBR1121(Jefferson, 1987(参考文献(7)))、pGEM4(An et al., 1988(参考文献(7)))、特開昭60-708080号(Esp20516)があり、これらをもとに数多くの新しいバイナリーベクターが構築され、形質転換に利用されている。また、R⁻ プラスミドのシステムにおいて、同様なベクターが構築され形質転換後に用いられている。

[0016] アダプトクベリウムA238(Watson et al., 1975 (参考文献(41)))は、強腐食性、super-volatileの構成であり、その宿主鉱物は広く、超早期熱変質の鉱物系より高い(Hood et al., 1987(参考文献(33)))ものにも存在する(Hood et al., 1989(参考文献(33)))。この特性は、A238が存在する17プラズミドの約10to34%によるものである(Hood et al., 1984(参考文献(35)); Jin et al., 1987 (参考文献(22)); Komari et al., 1986(参考文献(26)))。

【0017】p1B054を用いて、これまで2つの新しいシステムが開発されている。一つはp1B054Qのデザイン型のアーム型のプログラミスを有する樹乳EAMUM(Hood et al., 1996(参考文献(17)))およびEAMU5(Hood et al., 1996(参考文献(17)))を用いたものであり、これらを上記述のバイナリベクタープログラムに適用することにより、

形に利用されている。もう一つは、スーパーバイナリナリベクター（super-binary vector）(Hiei et al., 1991) ベクター (Ishida et al., 1996)(参考文献(20)) W394/O5877号(参考文献(13))； Ishida et al., 1999(参考文献(28)) Komari et al., 1999(参考文献(4)) のこのシステムでは、W395/O6722号システムである(図)。このシステムでは、vif/vpr/gag(vif, vifR, vifC, vifD, vifE及びvifX)というコードをそれぞれ「1」で示すという(以下、これらをサポートディスタンス型と呼ばれる)。(以下、これらをサポートディスタンス型のプラズミドともいう。) を持つディスタンス型のプラズミドにおも、バイナリ・ONEを有するプラズミドからなること、バイナリ・リーベクターシステムの種類である。しかしながら、

DNAを有する側のプラスミド、即ちバイナリーベクターでない断片領域のうち、少なくとも一つの断片領域は大きくて複製に必要とされる領域の断片(この方が好ましく)で、少なくとも二つ以上の断片を含む断片、さらに好ましくは、一つ及び二つ以上の断片を含む断片を用いる。(参考文献(24))スーパーバイナリーベクターを用いる点に留意する。なお、スーパーバイナリーベクターを含有するクローニングシステムに、所望の遺伝子を組み込んだり、DNA領域を導入するには、三系交雑法を紹介した相刈組

9

えが容易な半環として用いである (Komari et al., 1996; 参考文獻 (27))。このスベークターシステムと比べて、多
システムは、上述の種々のベクターシステムと比べて、多
くの植物種で非常に高い質の転換率をもたらすことが
明らかとなっている (Hleiet al., 1994 (参考文獻 (13));
Ishida et al., 1996 (参考文獻 (20)); Komari, 1996
(参考文獻 (23)); Li et al. (参考文獻 (29)), 1996; Sai
et al. (参考文獻 (37)))。

〔0018〕本発明の方法においては、宿主となるアクロバテリウム菌類（例えば上述の *Acrobacterium tumefaciens* (1844/40)(Weikma et al., 1983)(抄考文献(14))および *EHAT11* (Rhodema et al., 1986)(抄考文献(15))）を、用いることが可能である。

【0018】本発明の方法によれば、アグロバクテリウム属細胞における南原性(vir)領域の遺伝子群の発現に基づき、選出系導入系であれば、特に限定されることとなっており、上述の如く有意な効果を得ることができ、したがって、上述の中間ベクター、バイナリーベクター、強南原性のバイナリーベクター、スーパーバイナリーベクターなどといずれのベクターを用いてもよい。

のペグチーシスラムに対してでも用いることができ、本発明による効果を得ることができる。これらのペグチーシスラムを改変した異なるペグチーシスラムを用いた場合には、ペグチーシスラムと同様である（例えば、アグロバチウム農薬ミッドの一部または全部を切り出し付加的にアグロバチウム農薬ミッドに組み込む）。v領域の一部または全部を切り出し新たなアグロバチウム農薬ミッドの一部としてアグロバチウム農薬ミッドに入するなど）。また、当然ではあるが本発明の方法においても、野生型のアグロバチウム農薬ミッドにおいても、植物を向上させることである。

植物を向上させることは、

(0020) 植物に導入しようとする所望の遺伝子は、上記プラズミドのT-DNA領域の制限酵素部位に化学法により組み込むことで、当該プラズミドと同時に等しい制限酵素で消化した、バロモニン等のDNAをT-DNA領域内の制限酵素部位で同時に組み込み、アガロゼゲル電気泳動法により選別することによって導入される。大型多量体の制限酵素の手法は、通常、DNAをT-DNA領域内に導入することが必ずしも容易でないことがわかる。このような場合には、三系交雑に、アガロゼゲル電気泳動法を用いて、アガロゼゲル電気泳動法により選別することによって導入される。

【0021】また、プラスミドをAgrobacterium tumefaciens等のアグロバチウム属細菌に導入する操作(以下、従来法により行うことがで、例としては、上記した系交雑法やエレクロポレーション法、エレクロポレーション法やエレクロポレーション法による方法、ジェクション法、*in situ*の化学的な処理による方法)が含まれる。

【0022】植物に導入しようとする遺伝子は、従来技術と同様に基本的にはT-DNAの左右境界配列の間に

示さなかった。

【0049】スーパーバイナリーベクターであるLB4404(pS8131)を接種したA188未熟胚での形質転換結果を表8に示す。熱処理していない対照の未熟胚からは、10.7%の効率が形質転換植物が得られた。これに対し、46℃、5分間の熱処理を行った未熟胚では、形質転換効率は20%で、無処理の約2倍に効率が向上した。接種直後の遺伝子をもたない通常のバイナリーベクターであるLB4404(pS8131)を接種したA188未熟胚での形質転換結果を表4に示す。熱処理していない対照の未熟胚からは、形質転換植物は得られなかった。これに対し、46℃、5分間の熱処理を行った未熟胚では、2個体の独立した形質転換植物が得られた。形質転換効率は2.4%であった。

【0050】以上の結果から、スーパーバイナリーベクターを用いた場合、材料の未熟胚を接種前に熱処理することにより、従来法に比べ遺伝子導入効率が増大し、また、形質転換効率が向上することが明らかとなった。さらに、今までにスーパーバイナリーベクターを用いた通常の形質転換においては成功例のない通常のバイナリーベクターにおいても熱処理することにより初めて形質転換植物が得られた。これらのことから、従来のアグロバクテリウム法では形質転換できなかったA188胚に*

46℃処理時間(min)	GUS			
	供試	未熟胚	+	-
0	19	0	1	18
1	20	0	2	18
3	20	2	5	13
5	20	1	5	14
10	20	5	3	12

共存培養後の未熟胚でのGUS遺伝子のトランジェントな発現の結果

【0052】

【表8】表8 熱処理の遺伝子導入効率に及ぼす影響

接種菌株	処理	GUS			
		供試	未熟胚	+	-
LB4404 (p102116)	46℃ 5 min	12	0	3	9
	無処理	12	0	1	2
BM101 (p102116)	46℃ 5 min	14	2	9	3
	無処理	13	0	3	9
LB4404 (p102233)	46℃ 5 min	16	9	6	0
	無処理	18	0	6	10
LB4404 (pS8131)	46℃ 5 min	15	0	2	13
	無処理	15	0	0	2

共存培養後の未熟胚でのGUS遺伝子のトランジェントな発現の結果 ※【表9】表9 熱処理の形質転換効率に及ぼす影響 (LB4404(pS8131)を導入)

【0053】

処理	供試	未熟胚	PPT耐性カルス (%)	PPT耐性植物 (%)	GUS+植物 (%)
46℃ 5 min	30	18 (60.0)	15 (50.0)	5 (16.7)	5 (15.7)
無処理	28	9 (32.1)	9 (32.1)	3 (10.7)	3 (10.7)

カルス数、植物数はいずれもクロロンを含まない。 【0054】

【表10】表10 熱処理の形質転換効率に及ぼす影響 (LB4404(pS8131)を導入)

処理	供試	未熟胚	PPT耐性カルス (%)	PPT耐性植物 (%)	GUS+植物 (%)
46℃ 5 min	84	71.4	7 (8.3)	2 (2.4)	2 (2.4)
無処理	20	0	0	0	0

カルス数、植物数はいずれもクロロンを含まない。トランジェント発現は、共存培養後の一部のカルスを採取して調査した。 【0058】

【0055】表例3

クリーピングダントグラス (*Agrostis palustris* cv. P encross, 雪印種苗 (株)) の完熟種子を滅菌後、MS無機塩、MSビタミン、4 mg/l dicamba, 0.5 mg/l 6BA, 0.7 mg/l 2,4-D, 0.5 mg/l ME5, 20 mg/l ショ糖、3 mg/l gelrite (pH5.8) を含む培地 (TC2培地) に懸濁し、25℃、暗黒下で培養した。接種されたカルスを同組成の培地で継代培養し、エンブリオジェニックなカルスを増殖した。継代後、2週間目のカルス約0.3gをTC2培地

処理	供試	未熟胚	PPT耐性カルス (%)	PPT耐性植物 (%)	GUS+植物 (%)
46℃ 5 min	84	71.4	7 (8.3)	2 (2.4)	2 (2.4)
無処理	20	0	0	0	0

【0059】表例4

(1) 供試組織および供試菌株

タバコ品種ブライトイロー2号の胚嚢培養細胞株B2Dを含む胚嚢培地で25℃暗条件下で培養し、1週間貯蔵した後に培地を5分間交換した。対照は、室温で同じ培地に培養した。培地を除き、100μMのアセトシリンゴンを含むTC2-in培地 (TC2培地からブローリン、ME5、gelriteを除き、48.46 mg/l ショ糖、36.04 mg/l グルコースを添加(pH 5.2)) に約1 x 10⁶ cfu/mlの濃度で、LB4404 (p102233) (Hiei et al., 1994 (参考文献(23))) を懸濁した液1.0 mlを加え、30秒間ボルテックスミキサーにより攪拌した。5分間室温で静置した後、TC2培地に10 mg/l グルコース、100 μM アセトシリンゴンを、4 mg/l タイプ1アガロース (pH5.8) を添加した培地 (TC2-AS培地) に懸濁した。25℃、暗黒下で3日間培養した後、一部のカルスを採取し、表例1と同様にX-galucによりGUS遺伝子のトランジェントな発現を調査した。

【0060】表例5 (2) 無処理 組代後4日目の胚嚢培養細胞約0.3 gを1 mlの滅菌水の入ったチューブに浸漬した。チューブを37℃または46℃に設定したウォーターバスに10分〜20分浸漬することにより熱処理を行った。対照処理区は、室温 (25℃) で静置することによって、熱処理終了後は、チューブを流水で冷却した。

【0061】(3) 接種および共存培養 胚嚢培養細胞へのアグロバクテリウムの接種および共存培養は、Komari (1989) (参考文献(23))の方法により実施した。25℃暗黒下で2日間共存培養した後、胚嚢培養細胞を、Hiei et al. (1994) (参考文献(23))の方法により表例1と同様にX-galuc処理によるGUS遺伝子の発現調査に供した。

【0062】(4) 結果

胚嚢培養細胞を熱処理し、LB4404(p102233)との共存培養を行い、GUS遺伝子の一過性発現を調査した結果を表12に示した。無処理区に比べ熱処理をした場合に、GUS発現を示す細胞の頻度は明らかに高く、より高頻度で遺伝子導入が生じたものと解釈された。熱処理は、イネ、トウモロコシおよびシバなどの種子胚植物だけではなく、双子葉植物の遺伝子導入にも効率を向上させる効果があることが確認された。

【0063】

【表12】表12 処理温度と胚嚢培養細胞の2におけ

図1は遺伝子の一過性発現

処理温度	処理時間	OD550を示した細胞の増殖率*
無処理 (対照)	-	+
40°C	10分	++
40°C	20分	+++
40°C	10分	+++

* +: 低い, ++: やや高い, +++: 高い

供試菌株: LB4404 (pTOC233), 共培養期間: 2日

【0064】

【発明の効果】本発明により、従来のアグロバクテリウム法による遺伝子導入方法よりも高い効率で、組織を付与することなく簡単に遺伝子導入を行うことができる。植物細胞への遺伝子導入の効率を向上させる方法が提供された。本発明の方法は、単子葉植物に対しても双子葉植物に対しても適用可能である。また、シバのように、従来のアグロバクテリウム法では形質転換することができなかった植物も、本発明の方法により形質転換が可能になった。

【0065】参考文献

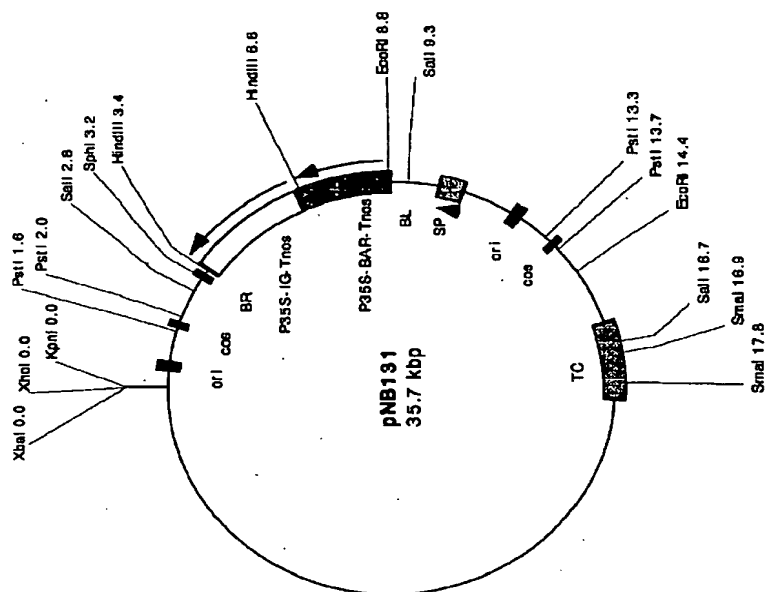
- (1) Aldamita RR, Hodges TK (1996) Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of japonica and indica rice varieties. *Planta* 199: 612-617
- (2) An, G., Evert, P.R., Mitra, A. and Ha, S.B. (1988) Binary vectors. In Galvin, S.B. and Schilperoort, R.A. (eds.), *Plant Molecular Biology Manual A* 3. Kluwer Academic Press, Dordrecht, pp. 1-19.
- (3) Asano, Y., Ueki, M. (1994) Transgenic plants of *Azorella alba* obtained by electroporation-mediated direct gene transfer into protoplasts. *Plant Cell Reports* 13:243-246.
- (4) Asano, Y., Ito, Y., Fukami, M., Sujiura, K., Fujie, A. (1998) Herbicide-resistant transgenic creeping bentgrass plants obtained by electroporation using an altered buffer. *Plant Cell Reports* 17:93-97.
- (5) Bevan, M. (1984) Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res.* 12, 8711-8721.
- (6) Bishay, D., Scelone, C., Martich, J., Burnus, M., Sims, L., and Lurie, G. (1992) Microprojectile bombardment of plant tissues increases transformation frequency by Agrobacterium tumefaciens. *Plant Mol. Biol.* 18, 301-313
- (7) Chan, M.-I., Cheng, H.-H., Ho, S.-L., Tong, W.-F., and Yu, S.-M. (1993) Agrobacterium-mediated production of transgenic rice plants expressing a chimeric α -amylase promoter/ β -glucuronidase gene.

- (8) Chilton, M.-D., Currier, T.C., Farrand, S.K., Bonnichsen, A.J., Gordon, M.P., and Nester, E.W. (1974) Agrobacterium tumefaciens DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71:3672-3676.
- (9) Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D. and Helin, M. (1980) Broadhost range DNA cloning system for Gram-negative bacteria: Construction of gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 7347-7351.
- (10) Fraley, R.T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., Eichholtz, D.A. and Flick, J.S. (1983) The SEV system: a new disarmed Ti plasmid vector for plant transformation. *Bio/technology*, 3, 629-635.
- (11) Fraley, R.T., Rogers, S.G., Horsch, R.B., Sanders, P.R., Flick, J.S., Adams, S.P., Bittner, M.L., Brand, L.A., Fink, C.L., Fry, J.S., Galluppi, G.R., Goldberg, S.B., Hoffmann, N.L. and Woo, S.C. (1983) Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80, 4893-4897.
- (12) Hartman, C.L., Lee, L., Day, P.R., Turner, N. E. (1994) Herbicide resistant turfgrass (*Azorella palustris* Hudson.) by biolistic transformation. *Biotechnology* 12:919-923.
- (13) Hiei, Y., Ohta, S., Kumari, T. and Kumashiro, T. (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by Agrobacterium and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant Journal*, 6, 271-282.
- (14) Heikema, A., Hirsch, P.R., Hooftkaas, P.J.J. and Schilperoort, R.A. (1983) A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the Agrobacterium tumefaciens Ti-plasmid. *Nature* 303, 179-180.
- (15) Hood, E.E., Fraley, R.T. and Chilton, M.-D. (1987) Virulence of Agrobacterium tumefaciens strains in A281 on legumes. *Plant Physiology*, 83, 529-534.
- (16) Hood, E.E., Gelvin, S.B., Melchers, L.S. and Heikema, A. (1993) Novel Agrobacterium helper plasmid system for gene transfer to plants. *Transgenic Res.* 2, 208-218.
- (17) Hood, E.E., Helmer, C.L., Fraley, R.T. and Chilton, M.-D. (1986) The hypervirulence of Agrobacterium tumefaciens A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. *J. Bacteriol.* 168, 1291-1301.
- (18) Hood, E.E., Jen, G., Kayes, L., Kramer, J., Fraley, R.T. and Chilton, M.-D. (1984) Restriction endonuclease map of pTiBo542, a potential Ti-plasmid vector for genetic engineering of plants. *Bio/tech*

- technology, 2, 702-709.
- (19) Horsch, R. B., Fry, J. E., Hoffmann, M. L., Eichholtz, D., Rogers, S. G. and Fraley, R. T. (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227, 1229-1231.
- (20) Ishida, Y., Saito, H., Ohta, S., Hiei, Y., Kumashiro, T. and Kumashiro, T. (1995) High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by Agrobacterium tumefaciens. *Nature Biotechnology*, 14, 745-750.
- (21) Jefferson, R.A. (1987) Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology*, 5, 387-405.
- (22) Jin, S., Komari, T., Gordon, M.P. and Nester, E.W. (1987) Genes responsible for the supervirulence phenotype of Agrobacterium tumefaciens A281. *J. Bacteriol.*, 169, 4417-4425.
- (23) Komari, T. (1989) Transformation of callus cultures of nine plant species mediated by Agrobacterium. *Plant Sci.*, 60, 223-229.
- (24) Komari, T. (1990a) Genetic characterization of a double-flowered tobacco plant obtained in a transformation experiment. *Theor. Appl. Genet.*, 80, 167-171.
- (25) Komari, T. (1990b) Transformation of cultured cells of *Oenothera lutea* by binary vectors that carry a fragment of DNA from the virulence region of pTiBo542. *Plant Cell Reports*, 9, 303-306.
- (26) Komari, T., Halperin, W. and Nester, E.W. (1986) Physical and functional map of supervirulent Agrobacterium tumefaciens tumor-inducing plasmid pTiBo542. *J. Bacteriol.*, 166, 88-94.
- (27) Komari, T., Hiei, Y., Saito, Y., Murai, N. and Kumashiro, T. (1996) Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by Agrobacterium tumefaciens and segregation of transformants free from selection markers. *Plant J.*, 10, 165-174.
- (28) Komari, T. and Kubo, T. (1999) Methods of Genetic Transformation: Agrobacterium tumefaciens. In Vasil, I.K. (ed.) *Molecular improvement of cereal crops*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 43-82.
- (29) Li, H.-Q., Sautter, C., Potrykus, T. and Poon, H.-K. (1996) Genetic transformation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Nature Biotechnology*, 14, 736-740.
- (30) Lindsey, K., Galliois, P. and Eady, C. (1991) Regeneration and transformation of sugarcane by Agrobacterium tumefaciens. *Plant Tissue Culture Manual*

- al. 87:1-13. Kluwer Academic Publishers.
- (31) McCormick, S. (1991) Transformation of tomato with Agrobacterium tumefaciens. *Plant Tissue Culture Manual* 16:1-9. Kluwer Academic Publishers.
- (32) Miralpeque, T. and Skoog, F. (1962) *Physiol.* 15:473-497.
- (33) Ohta, S., Mita, S., Hattori, T., Nakamura, K., (1990) Construction and expression in tobacco of a β -glucuronidase (GUS) reporter gene containing an intron within the coding sequence. *Plant Cell Physiol.* 31:805-813.
- (34) Potrykus, J., Hams, C. T. and Lörz, H. (1979) Callus formation from cell culture protoplasts of corn (*Zea mays* L.). *Theor. Appl. Genet.* 54:209-214.
- (35) Potrykus, J., Bilang, R., Fütterer, J., Suitt, C. and Schrott, M. (1998) *Agricultural Biotechnology*, Marcel Dekker Inc. pp. 119-159.
- (36) Rogers, S.G., Horsch, R.B. and Fraley, R. T. (1988) Gene transfer in plants: Production of transgenic plants using Ti plasmid vectors. *Method for Plant Molecular Biology*, CA: Academic Press Inc. pp. 423-436.
- (37) Saito, Y., Komari, T., Masuta, C., Hayashi, Y., Kumashiro, T. and Takahashi, Y. (1992) Chimeric virus-tolerant transgenic tomato plants expressing a satellite RNA. *Theor. Appl. Genet.*, 83, 679-683.
- (38) Toriyama, K. and Hinata, K. (1985) *Plant Science*, 41:179-183.
- (39) Trick, H.N. and Finer, J.J. (1997) SAAT: a cation-assisted Agrobacterium-mediated transformation. *Transgenic Research* 6:329-336.
- (40) Visser, R.G.F. (1991) Regeneration and transformation of potato by Agrobacterium tumefaciens. *Plant Tissue Culture Manual* 15:1-9. Kluwer Academic Publishers.
- (41) Watson, B., Currier, T.C., Gordon, M.P., Chilton, M.-D. and Nester, E.W. (1975) Plasmid required for virulence of Agrobacterium tumefaciens. *J. Bacteriol.* 123, 255-264.
- (42) Xiao, L., Ha, S.-B. (1997) Efficient selection and regeneration of creeping bentgrass transformation following particle bombardment. *Plant Cell Reports* 16:874-878.
- (43) Zambryski, P., Joss, H., Genetello, C., Leonardi, J., Van Montagu, M. and Schell, J. (1983) Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal recombination capacity. *EMBO J.*, 2, 2143-2150.

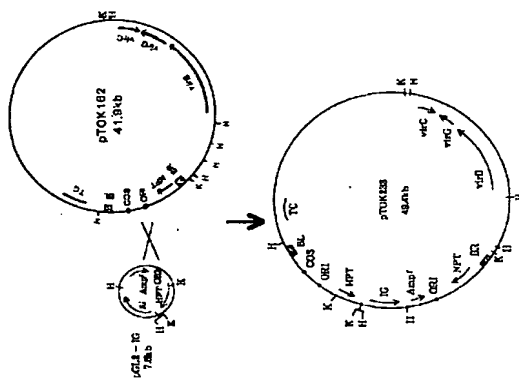
【図2】



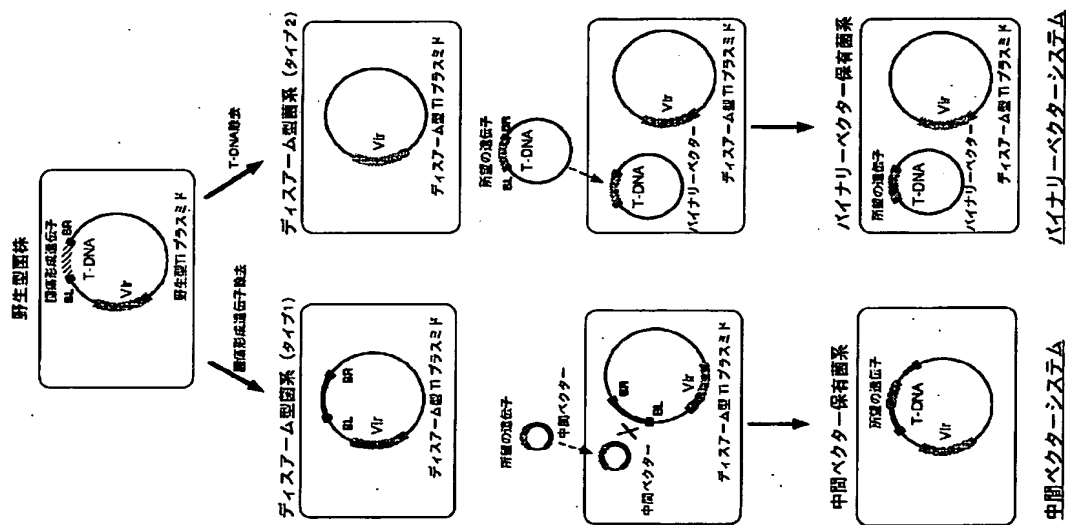
24

- (44) Zhong, H., Bolyard, M.G., Srinivasan, C., Stricklen, M.B. (1993) Transgenic plants of *Turritis* (*Arabis* *palustris* (L.) from microprojectile bombardment of embryonic callus. *Plant Cell Report* 13:1-6.
- 【図面の簡単な説明】
- 【図1】本発明の方法に好ましく用いることができるスーパーバイナリーベクターの例であるpTOK133の構築法を示す図である。
- 【図2】本発明の方法に好ましく用いることができるバイナリーベクターの例であるpNB131の遺伝子地図を示す図である。
- 【図3】アグロバクテリウム属細菌の主要な2種類のベクターシステムである中間ベクターシステムとバイナリーベクターシステムの構築過程を示す模式図である。
- 【図4】アグロバクテリウム ツメファシエンスの癌病原性菌株A28に由来する2種類のバイナリーベクターシステムを示す模式図である。
- 【符号の説明】
- BL アグロバクテリウム属細菌のT-DNAの左ボート
-配列
BR アグロバクテリウム属細菌のT-DNAの右ボート
-配列
TC テトラサイクリン抵抗性遺伝子
- * 断片
- SP スペクチノマイシン抵抗性遺伝子
IG イントロンGUS遺伝子
NPT ハイグロマイシン抵抗性遺伝子
NPT カナマイシン抵抗性遺伝子
K 制限酵素KpnI部位
H 制限酵素HindIII部位
Amp^r アンプシリン耐性遺伝子
BAR bar遺伝子
COS, cos ラムダファージのCOS部位
ORI, ori ColE1の複製開始点
P35S CaMV 35Sプロモーター
Tnos ノバリン合成酵素遺伝子のターミネーター
virB Agrobacterium tumefaciens A28に含まれるTiプラスミドpTiBo542のゲイルレンス領域中のvirB遺伝子
virC Agrobacterium tumefaciens A28に含まれるTiプラスミドpTiBo542のゲイルレンス領域中のvirC遺伝子
virG Agrobacterium tumefaciens A28に含まれるTiプラスミドpTiBo542のゲイルレンス領域中のvirG遺伝子
Vir アグロバクテリウム属細菌のTiプラスミドの全vir配列
S Vir 強固性アグロバクテリウム属細菌のTiプラスミドpTiBo542の全vir領域
S vir⁺ TiプラスミドpTiBo542のvir領域の一部を含む断片

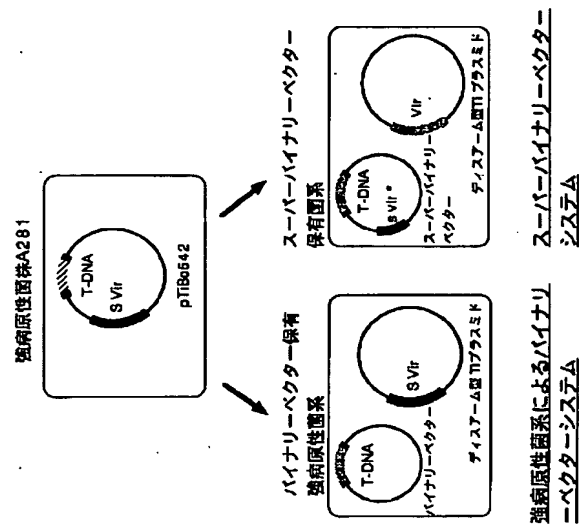
【図1】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

(72)発明者 石田 祐二
静岡県静岡市駿河区東原700番地 日本たばこ産業株式会社通信研究所内

Fターム(参考) 28030 AA02 AB03 AD20 CA19 CB03
CD03 CD06 CD09 CD13 CD14
CD17
4B024 AA08 DA01 CA11 HA20